



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	脂質の分配クロマトグラフィー
Author(s)	高橋, 是太郎
Description	オイルコーナー
Citation	油化学, 37(4), 307-309
Issue Date	1988
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/42796
Type	journal article
File Information	takahashi_JJ0CS37.pdf



オイルコーナー

脂質の分配クロマトグラフィー

高橋 是太郎

北海道大学水産学部 (〒041 函館市港町 3-3-1)

天然界の多くのグリセリドは、通常多種類の脂肪酸から成り立っているもので、これらの脂肪酸の組み合わせから成るグリセリドの分子種の組成は複雑な場合が多い。このことが個々の分子種の分画、同定を困難にしてきた。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) における分子種の分析は、まず溶出時間の経験的分離因子の規定から始まった。これが和田らの有名な Partition number (PN), Plattner らの Equivalent carbon number (ECN), Porter らの Effective carbon number (EC) と呼ばれるものである。すなわち、グリセリド分子種のアシル基の総炭素数を CN, 総二重結合数を DB とすると, $PN = ECN = CN - 2 \cdot DB$ (トリアシルの場合), $EC = CN - DB$ (ジアシルの場合) となり、したがって, CN が多い分子種ほど遅く溶出し、反対に DB が多いほど早く溶出することになる。PN や EC はグリセリドのおおよその溶出時間を知る上で非常に便利であり、今日でも広く利用され用いられている。しかしながら、これらはいずれも CN と DB の値を算出のよりどころとしているので、同一の PN や EC をとる多数の異なる分子種が存在することから、PN や EC だけでは個々の分子種を直接同定することはできない。

1980 年代に入り、HPLC の分解能や理論段数の大幅な向上に伴い、個々の分子種を直接同定すべく PN を補正した Theoretical carbon number と呼ばれる経験式も提唱されてはきたが、基本的には PN に補正項を加えたものであり、PN ほどの impact はなかったように思われる。

本稿では、このように今まで専ら経験的に扱われてきたクロマトグラフィーによる脂質の分子種の分析法に多少なりとも系統的な考え方を導入し、個々の分子種を直接同定するための溶出法則とその理論的根拠を提示したいと思う。

ペーパークロマトグラフィー (これは固定相を水とするれっきとした分配クロマトグラフィーである) でノーベル賞を受賞した A. J. P. Martin は、次の 3 つの関係を見いだした。すなわち、分配クロマトグラフィーにおいては、

$$\ln \alpha_A = \frac{\Delta \mu_A}{R \cdot T} \quad (1)$$

$$\ln \alpha_B = \frac{\Delta \mu_A}{R \cdot T} + \frac{\Delta \mu_X}{R \cdot T} \quad (2)$$

$$\ln \left(\frac{\alpha_B}{\alpha_A} \right) = \frac{\Delta \mu_X}{R \cdot T} \quad (3)$$

(ただし、A と B は同族体同士であり、X は A と B の分子構造上の差を表す; α : 分配係数; μ : ケミカルポテンシャル; R : 気体定数; T : 絶対温度を表す) が成り立つ。ここで、式(1)と式(2)より

$$\frac{\Delta \mu_B}{R \cdot T} = \frac{\Delta \mu_A}{R \cdot T} + \frac{\Delta \mu_X}{R \cdot T} \quad (4)$$

も成り立つことになる。この式は以下の式(5)~(8)のように拡張解釈することにより、後述のように個々の分子種の保持時間の予測に大いに役立つのである。

$$\frac{\Delta \mu_{DG}}{R \cdot T} = \frac{\Delta \mu_{acyl1}}{R \cdot T} + \frac{\Delta \mu_{acyl2}}{R \cdot T} \quad (5)$$

$$\frac{\Delta \mu_{alkenylacyl}}{R \cdot T} = \frac{\Delta \mu_{alkylacyl}}{R \cdot T} + \frac{\Delta \mu_{acyl}}{R \cdot T} \quad (6)$$

$$\frac{\Delta \mu_{alkylacyl}}{R \cdot T} = \frac{\Delta \mu_{alkyl}}{R \cdot T} + \frac{\Delta \mu_{acyl}}{R \cdot T} \quad (7)$$

$$\frac{\Delta \mu_{TG}}{R \cdot T} = \frac{\Delta \mu_{acyl1}}{R \cdot T} + \frac{\Delta \mu_{acyl2}}{R \cdot T} + \frac{\Delta \mu_{acyl3}}{R \cdot T} \quad (8)$$

(DG はジアシル型のグリセロリン脂質、ジアシルグリセリンならびにその誘導体、TG はトリアシルグリセリンを示す)

他の脂質クラスについても上記と同じ考え方が適用できることは間違いないと思われるが、この点の証明に関しては今後のデータに待たねばならない。

さて、一般的な分配クロマトグラフィーでは、温度が一定の条件で分析が行われるのが普通である。したがって式(1)~(3)において $1/R \cdot T$ は比例定数に相当することになる。よって

$$\ln \left(\frac{\alpha_B}{\alpha_A} \right) \propto \Delta \mu_X \quad (9)$$

すなわち、 α_A と α_B の比の対数値はケミカルポテンシャルに比例するわけであるが、今ここで α_A を相対保持時間 (RRT) 算出のための基準脂質分子種の分配係数、 α_B を任意の脂質分子種の分配係数とすると α_B/α_A は分子種 B の RRT を意味することになる。このことから式(9)は

$$\ln \left(\frac{\alpha_B}{\alpha_A} \right) = 2.303 \cdot \log (RRT) \propto \Delta \mu_X$$

と表され、ケミカルポテンシャルは $\log (RRT)$ とも

比例関係にあることになる。

今、相対保持時間の常用対数値 $[\log(RRT)]$ を相対保持ポテンシャル指数 Relative retention potential index (略して RPI) と定義すると

$$\log(RRT) = RPI \propto \Delta \mu_x$$

なる関係があることになるから式(5)は

$$\log(RRT)_{DG} = \log(RPT)_{acyl_1} + \log(RRT)_{acyl_2} \quad (10)$$

式(6)は

$$\log(RRT)_{alkenylacyl} = \log(RRT)_{alkenyl} + \log(RRT)_{acyl} \quad (11)$$

式(7)は

$$\log(RRT)_{alkylacyl} = \log(RRT)_{alkyl} + \log(RRT)_{acyl} \quad (12)$$

式(8)は

$$\log(RRT)_{TG} = \log(RRT)_{acyl_1} + \log(RRT)_{acyl_2} + \log(RRT)_{acyl_3} \quad (13)$$

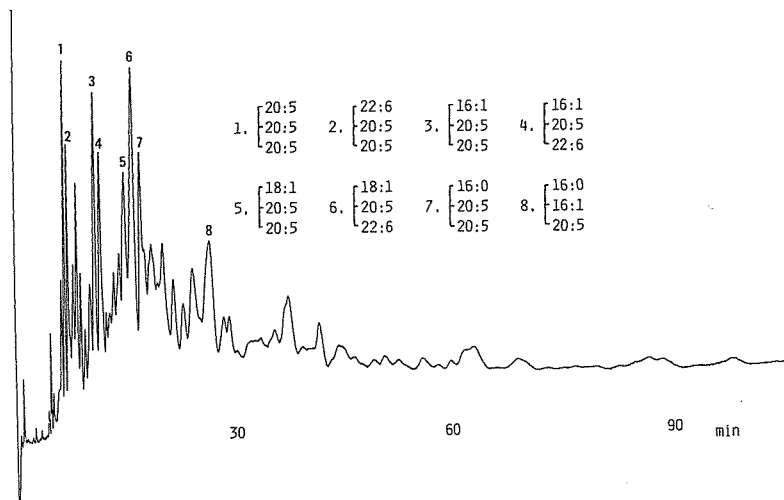
と書き表すことができる。これら式(10)~(13)は次の意味において非常に有用である。

- 1) 同一の脂質クラスであれば、その脂質クラスの構成要素の RPI の和の形で任意の分子種の RPI を算出できる。

表-1 一定条件下の逆相 HPLC における標品 (既知) トリアシルグリセリンの相対保持時間

分 子 種	Source	相対保持時間*
(14:0, 14:0, 14:0)	Sigma Chemical Company	418.8
(16:0, 16:0, 16:0)	"	1,256.0
(16:1 ω 9, 16:1 ω 9, 16:1 ω 9)	Nu-Chek-Prep, Inc.	382.8
(18:1 ω 9, 18:1 ω 9, 18:1 ω 9)	Sigma Chemical Company	952.8
(18:2 ω 6, 18:2 ω 6, 18:2 ω 6)	"	382.8
(18:3 ω 3, 18:3 ω 3, 18:3 ω 3)	"	166.0
(20:3 ω 3, 20:3 ω 3, 20:3 ω 3)	オゴノリ (<i>Gracilaria verrucosa</i>)	317.7
(20:4 ω 6, 20:4 ω 6, 20:4 ω 6)	"	220.3
(20:5 ω 3, 20:5 ω 3, 20:5 ω 3)	スナガレイ (<i>Linanda punctatissima</i>)	100.0
(18:0, 18:1 ω 9, 18:0)	カカオ脂	2,233.6
(22:6 ω 3, 20:5 ω 3, 20:5 ω 3)	スナガレイ	106.1

* (20:5, 20:5, 20:5) を基準とした場合



* カラム: Supersphere PR-18, 250×4 mm, 溶媒: アセトン/アセトニトリル(1:1, vol/vol), 検出器: RI, 温度: 室温 (恒温室)

図-1 高分解能 HPLC によるスナガレイ筋肉トリアシルグリセリンのクロマトグラム

表-2 スナガレイ筋肉トリアシルグリセリンの主要分子種の実保持時間と相対保持ポテンシャル指数によって算出した保持時間との比較*¹

ピーク番号	分子種	実保持時間 (min)	予測保持時間 (min)	相対的なずれ (%)
1	(20:5 ω 3, 20:5 ω 3, 20:5 ω 3)* ²	7.06	—	—
2	(22:6 ω 3, 20:5 ω 3, 20:5 ω 3)* ²	7.49	—	—
3	(16:1 ω 9, 20:5 ω 3, 20:5 ω 3)	11.05	11.06	0.1
4	(16:1 ω 9, 20:5 ω 3, 22:6 ω 3)	11.77	11.72	0.4
5	(18:1 ω 9, 20:5 ω 3, 20:5 ω 3)	14.89	14.99	0.7
6	(18:1 ω 9, 20:5 ω 3, 22:6 ω 3)	15.94	15.88	0.4
7	(16:0, 20:5 ω 3, 20:5 ω 3)	16.89	16.44	2.7
8	(16:0, 16:1 ω 9, 20:5 ω 3)	25.70	25.69	$\approx$ 0

*¹ 図-1 参照*² 相対保持ポテンシャル指数の算出の基準となった分子種

2) *RPI* がわかればその親数を計算することにより *RRT* を求めることができる。

では、構成要素の *RPI* を求めるにはどうしたらよいのであろうか。まず、前提条件として同一脂質クラスの分子種の分析においては移動相の流速、温度、溶媒比を可能な限り一定とすることが不可欠となる。具体的計算方法について TG を例にあげると以下の手順となる。

初めに既知の単酸型分子種の HPLC ピークに注目してその *RRT* を求める。例えばいま一定分析条件下での既知分子種 (標品等) の *RRT* データが表-1 であったとする。(20:5, 20:5, 20:5) の *RRT* を基準値 (*RRT* = 100) とすると 20:5 (ω 3) の脂肪酸残基の *RPI* は $(\log 100.0)/3 = 0.667$ となる。同様に, 18:1 (ω 9) の場合は $(\log 952.8)/3 = 0.993$ となる。このようにして単酸型の既知分子種の *RRT* から容易に相当数の構成脂肪酸残基の *RPI* (ω 異性体はわずかながら異なった *RPI* を持つ) を算出できるが, たとえば (22:6, 22:6, 22:6) のように単酸型であっても標品の入手が比較的困難な場合は次の手順で構成脂肪酸残基の *RPI* を求める。図-1 のスナガレイの筋肉 TG の HPLC を例にあげると, まず, 図中の番号をふった主要 8 ピークのうち No. 1 はガスクロマトグラフィー (GC) による脂肪酸組成の分析の結果, 75% を 20:5 (ω 3) が占めていたことから (20:5, 20:5, 20:5) と同定され, No. 2 のピークは GC の結果, 2 mol の 20:5 (ω 3) と 1 mol の 22:6 (ω 3) の存在が確認されたことから (22:6, 20:5, 20:5) と同

定される。この分子種の *RRT* は 106.1 であることから *RPI* は $\log 106.1 = 2.026$ となり, 20:5 (ω 3) の脂肪酸残基の *RPI* は 0.667 であるから, 22:6 (ω 3) の脂肪酸残基の *RPI* は式 (13) を変形することにより, $2.026 - 0.667 - 0.667 = 0.692$ と算出される。表-2 は以上のようにして求めた *RPI* を基に, 式 (13) によって算出した保持時間と図-1 中の番号をふった主要同定ピークの実保持時間とを比較して, 両者の相対的なずれを示したものであるが, 表中に示されているように, 保持時間の予測値と実測値との間にはほとんど差異は認められない。

以上紹介した具体例は他のよりシンプルな脂質クラス (ジアシル, アルケニルアシル, アルキルアシル等) にも当然適用できるものであり, また, HPLC に限らず最近注目されている phenylmethylsilicone gum FSOT による GC の分子種の直接分析にも応用できる。ただし, この場合は昇温クロマトグラフィーとなるので *RPI* は保持温度に相当することになる。

以上のように, 今から 40 年近くも前にペーパークロマトグラフィーで築かれた Martin の理論は, 今日の HPLC を初めとする各種の分配クロマトグラフィーによってますますその有用性と確かさが証明される結果となった。年月の経過と共に色あせるどころか, なお一層輝きを増していくものが真に価値のある研究なのだというのを彼の論文は物語っている。

(昭和 63 年 2 月 15 日受理)